



Genotypering als hulpmiddel bij de verklaring van onverklaarbare dosis spiegel relaties

J.F.M. Roijers¹ en S.A. van der Vlies² .

¹ Centraal Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium (CKCHL) en ² ZiekenhuisApotheek Midden-Brabant (ZAMB)
TweeSteden Ziekenhuis,
Dr. Deelenlaan 5, 5042 AD Tilburg.

MW de Bruik heeft te kampen met een zeer ernstige depressie waarvoor de psychiater behandeling met nortriptyline heeft opgestart. Vanwege de blijvende lage bloedspiegels in relatie tot de gebruikte dosering laat de psychiater, ter uitsluiting van therapieontrouw, de medicatie onder streng toezicht

innemen. De bloedspiegels blijven echter laag.....

Hierboven geïllustreerd voorbeeld is een van die vele voorbeelden van toepassing van farmacogenetica in de klinische praktijk. Zowel uit bevindingen van kliniek als laboratorium blijkt dat er een aanzienlijke groep patiënten in de psychiatrie is die niet reageert op reguliere geneesmiddelendosissen. Deze patiënten hebben een verlaagde of verhoogde serumspiegel ten gevolge van een versneld of vertraagd metabolisme. Een bekend voorbeeld hiervan is de groep van de tricycli-

sche antidepressiva (TCA), zoals amitriptyline, clomipramine, imipramine, desipramine en nortriptyline. Bij de omzetting van TCA spelen de cytochroom P450 iso-enzymen CYP2D6 (debrisoquine-4-hydroxylase) en CYP2C19 (mefenytoïne-4-hydroxylase) een grote rol. Voor patiënten met een afwijkende serumspiegel van TCA kan na uitsluiten van geneesmiddelinteracties en therapieontrouw, het genotyperen van deze enzymen nuttig zijn bij het vinden van de oorzaak. In 2003 is in een gezamenlijk project van het klinisch chemisch (CKCHL) en klinisch farmaceutisch laborator-

um (KFL) ZiekenhuisApotheek Midden-Brabant (ZAMB), beide TweeStedenziekenhuis Tilburg, een project genotypering opgestart. Het resultaat hiervan is dat we in staat zijn tot het uitvoeren van het genotyperen van de meest voorkomende CYP2D6- en CYP2C19-allelen. Door het screenen van deze allelen worden de meest voorkomende mutaties gedetecteerd.

CYP2D6- en CYP2C19-allelen

Op dit moment zijn meer dan dertig mutaties van het CYP2D6 gen beschreven. De meest voorkomende gemuteerde allelen in het Kaukasische ras zijn CYP2D6*3 (2%), CYP2D6*4 (20%), CYP2D6*5 (2%) en CYP2D6*6 (2%) [1]. De verschillende allelen worden gekarakteriseerd door voor die allelen specifieke mutaties. Het CYP2D6*3 allel wordt gekarakteriseerd door een A₂₆₃₇ deletie, het CYP2D6*4 allel door een G₁₉₃₄A substitutie, het CYP2D6*5 allel door een deletie van het gehele CYP2D6 gen en het CYP2D6*6 allel door een T₁₇₉₅ deletie. Deze vier allelen hebben allen een deficiënt enzym tot gevolg. Aanwezigheid van twee afwijkende allelen resulteert in een vertraagd langzaam metabolisme (poor metaboliser) en daardoor een verhoogde serumspiegel. Een versneld metabolisme (ultrarapid metaboliser) wordt veroorzaakt door een genduplicatie van het CYP2D6*1, of *2 allel (2,5 %) [2]. De aanwezigheid van een duplicatie van het CYP2D6*4 allel heeft geen versneld metabolisme tot gevolg omdat dit allel niet codeert voor een actief enzym. Om deze reden moet er, indien een duplicatie en een CYP2D6*4 allel aanwezig is, worden vastgesteld of het om een duplicatie van het CYP2D6*1, *2 of *4 allel gaat.

Voor het CYP2C19 gen zijn op dit moment nog veel minder mutaties beschreven. Het meest voorkomende allel is CYP2C19*2. De prevalentie van poor metabolisers als gevolg van een CYP2C19 deficiëntie is 2-6% in de Kaukasische populatie en 18-23 % in de Oriëntaalse populatie [3]. In beide bevolkingsgroepen wordt

de deficiëntie in 75-85% van de gevallen veroorzaakt door het CYP2C19*2 allel [4]. Afgezien van een defect dat alleen gevonden is bij Japanners zijn er nog geen andere mutaties beschreven die verantwoordelijk zijn voor CYP2C19-deficiëntie. Bij personen die homozygoot zijn voor deze mutatie is het metabolisme van onder andere verschillende barbituraten, een aantal antidepressiva en andere CYP2C19-substraten sterk vertraagd.

Genotyperen in de praktijk

Voor er gestart kan worden met genotyperen wordt DNA geïsoleerd uit 300 µL EDTA-bloed. Om na te gaan of de isolatie goed verlopen is en omdat bij de analyse van de verschillende CYP2D6 allelen verschillende hoeveelheden DNA als uitgangsmateriaal wordt gebruikt, wordt na isolatie de concentratie en zuiverheid van het DNA bepaald m.b.v. een fotospectrometer. Voor het aantonen van de volgende CYP2D6 en CYP2C19 allelen wordt gebruik gemaakt van de moleculair biologische technieken die in het artikel 'Moleculair biologische technieken voor de detectie van CYP2D6- en CYP2C19-allelen' (ook dit nummer) zijn beschreven.

CYP2D6*3:

Voor het aantonen van het CYP2D6*3 allel wordt gebruik gemaakt van een tetra-primer PCR. In deze PCR wordt eerst een deel van het CYP2D6-allel geamplificeerd, waarna er een allel-specifieke amplificatie volgt. Het niet specifieke product heeft een lengte van 1106bp (=baseparen). Bij de allel-specifieke amplificatie ontstaat een product van 580bp indien het CYP2D6*3 allel aanwezig is en een 553bp product indien er een wildtype allel aanwezig is [5].

CYP2D6*4:

Voor het aantonen van het CYP2D6*4 allel wordt gebruik gemaakt van real-time PCR op de LightCycler. Indien het CYP2D6*4-allel aanwezig is, zullen de hybridisatie probes bij een lagere temperatuur van het DNA

smelten. Indien er één piek zichtbaar is bij een lage smeltemperatuur dan is de patiënt positief homozygoot voor het CYP2D6*4 allel. Dit houdt in dat de patiënt geen wildtype (normaal) allel heeft. Indien er twee pieken aanwezig zijn, waarbij één piek een lage smeltemperatuur heeft en één piek een hoge smeltemperatuur heeft dan heeft deze patiënt zowel een CYP2D6*4 allel als een wildtype allel. Is er bij de patiënt maar één piek met een hoge smeltemperatuur zichtbaar dan houdt dit in dat de patiënt in ieder geval geen CYP2D6*4 allel heeft [6].

CYP2D6*5:

Voor het aantonen van het CYP2D6*5 allel wordt gebruik gemaakt van een multiplex long PCR. De primers DPKup en DPKlow vormen een product van 5.1kb als het CYP2D6 wildtype allel aanwezig is. De Dup en Dlow primers vormen een product van 3.2kb als er een deletie van het CYP2D6 allel heeft plaats gevonden, CYP2D6*5 [5].

CYP2D6*6:

Voor het aantonen van het CYP2D6*6 allel wordt gebruik gemaakt van een tetra-primer PCR. In deze PCR wordt eerst een deel van het CYP2D6 allel geamplificeerd, waarna er een allel-specifieke amplificatie volgt. Het niet specifieke product heeft een lengte van 750bp. Bij de allel-specifieke amplificatie ontstaat een product van 356bp indien het CYP2D6*6 allel aanwezig is en een 421bp product indien er een wildtype allel aanwezig is [5].

CYP2D6*1/2/4x2:

Voor het aantonen van de duplicatie wordt gebruik gemaakt van een multiplex long PCR en een controle long PCR. Bij deze multiplex long PCR ontstaat een product van 5,2kb als er geen duplicatie aanwezig is en een product van 3,6kb indien er een duplicatie aanwezig is. Bij de controle long PCR ontstaat alleen een product indien er een duplicatie aanwezig is. De lengte van het product van de controle long PCR is 3,2kb [2]. Bij

aanwezigheid van een duplicatie en een CYP2D6*4 allel moet nog uitgesloten worden of er een duplicatie is van de allelen *1/2 of allel *4.

Daarvoor wordt een nested PCR (PCR met als uitgangsmateriaal een PCR product) uitgevoerd gevolgd door een digestie met het enzym *HphI*. Bij aanwezigheid van het allel *4 zal het 443bp grootte fragment geknipt worden in drie fragmenten van 262bp, 100bp en 71bp. Indien allel *1 of *2 aanwezig is ontstaan twee fragmenten met een lengte van 362bp en 71bp [1].

CYP2C19*2:

Voor het aantonen van het CYP2C19*2 allel wordt gebruik gemaakt van een PCR gevolgd door een digestie.

Bij deze methode wordt er gebruik gemaakt van het feit dat bij een CYP2C19*2 allel een knipplaats voor het *SmaI* enzym vervalft. Indien het CYP2C19*2 allel aanwezig is, wordt het PCR-product niet geknipt en is er een fragment van 321bp zichtbaar. Als het wildtype allel aanwezig is, wordt het PCR-product door het *SmaI* enzym geknipt en ontstaan er twee fragmenten met een lengte van 212bp en 109bp.

Twee praktijkvoorbeelden

Uit bovenstaande blijkt dat het genotyperen voor CYP2D6 niet altijd even eenvoudig is. De resultaten van de verschillende analyses moeten worden samengevoegd voordat er een uiteindelijk resultaat kan worden geformuleerd. Verder moet

steeds in het achterhoofd worden gehouden dat er naast de allelen waar hier naar gekeken wordt er ook nog meer niet frequent voorkomende allelen zijn. Ter verduidelijking worden hier de resultaten van enkele praktijkvoorbeelden beschreven. Van beide patiënten is een aanvraag bij ons gedaan vanuit de kliniek. De behandelend psychiaters bereikten geen resultaat met voorgeschreven therapieën. Beide patiënten bleken therapietrouw te zijn en met TDM is vastgesteld dat hun serumspiegels voor de voorgeschreven TCA afwijkend hoog was (zie Figuur 1).

Bij patiënt X werden de volgende afzonderlijke resultaten gevonden: Bij de tetra-primer PCR voor CYP2D6*3 werd naast het 1106bp controle product het 553bp product gevonden. Het 580bp product wat specifiek is voor de aanwezigheid van het CYP2D6*3 allel werd niet gevonden, oftewel deze patiënt heeft geen CYP2D6*3 allel.

Bij de LightCycler analyse om aan te tonen of het CYP2D6*4 allel aanwezig is werd één piek met een lage smelttemperatuur gevonden. Dit houdt in dat er bij deze patiënt, naast het CYP2D6*4 allel geen wildtype allel werd gevonden (figuur 1).

Bij de multiplex long PCR voor CYP2D6*5 werd zowel een product van 5,1kb als een product van 3,2kb gevonden. Dit houdt in dat er bij deze patiënt een deletie van één van de twee CYP2D6 genen heeft

plaatsgevonden (figuur 2).

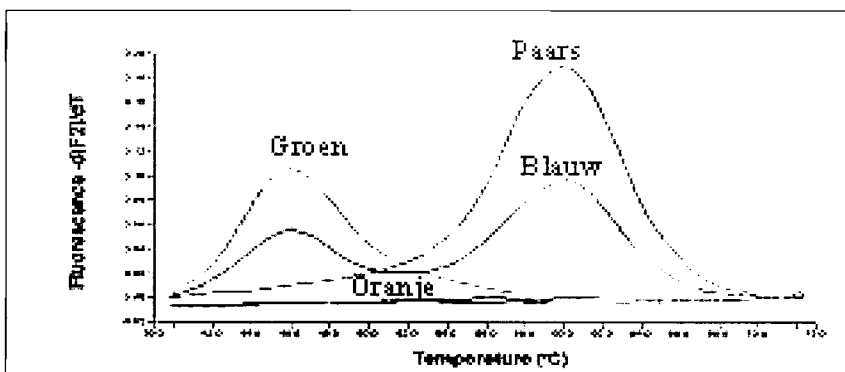
Bij de tetra-primer PCR voor CYP2D6*6 werd naast het 750bp controle product het 421bp product gevonden. Het 356bp product, wat specifiek is voor de aanwezigheid van het CYP2D6*6 allel, werd niet gevonden, oftewel deze patiënt heeft geen CYP2D6*6 allel.

Bij de multiplex long PCR voor de duplicatie werd alleen het 5,2 kb product gevonden. Dit houdt in dat er bij deze patiënt geen duplicatie van het CYP2D6 allel aanwezig is.

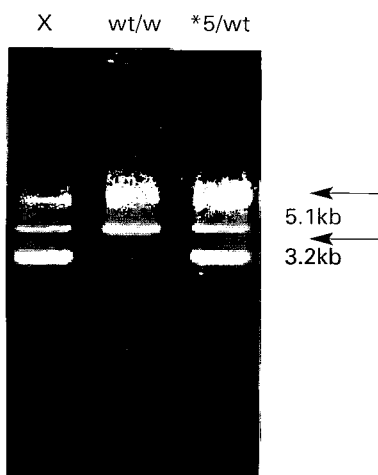
Bij de analyse voor CYP2C19*2, een PCR gevolgd door een digestie met *SmaI*, werden drie fragmenten gevonden met de lengten 321bp, 212bp en 109bp. Dit houdt in dat de patiënt naast een CYP2C19*2 allel ook een wildtype allel heeft.

Uitgaande van de analyse voor CYP2D6*4 zou de conclusie van dit onderzoek zijn dat deze patiënt positief homozygoot is voor CYP2D6*4, oftewel dat deze patiënt twee CYP2D6*4 allelen zou hebben. Als echter alle resultaten naast elkaar gelegd worden, blijkt dat deze patiënt een deletie van het CYP2D6 gen heeft. Dit houdt in dat deze patiënt in plaats van twee CYP2D6 allelen, maar één CYP2D6 allel heeft en dat bij de andere CYP2D6 analyses er maar naar één gen wordt gekeken. De patiënt heeft dus geen twee CYP2D6*4 allelen, maar één CYP2D6*4 en één CYP2D6*5 allel. Naast deze twee CYP2D6 allelen die beiden een deficiënt enzym tot gevolg hebben heeft deze patiënt ook nog één CYP2C19*2 allel. Deze patiënt zal vanwege een verlaagde activiteit van het CYP2C19 en het CYP2D6 iso-enzym bepaalde geneesmiddelen minder snel omzetten.

Bij patiënt Y werden de volgende afzonderlijke resultaten gevonden: Bij de tetra-primer PCR voor CYP2D6*3 werden geen specifieke producten gevonden. Zowel het 1106bp controle product als het 580bp product wat specifiek is voor het CYP2D6*3 allel, als het 553bp product wat specifiek is voor het



Figuur 1. LightCycler resultaten van de CYP2D6*4 analyse. Blauw is een positief heterozygote controle; Paars is een wildtype controle; Oranje is een negatieve watercontrole; Groen is patiënt X en Rood is patiënt Y.



Figuur 2. Resultaten van een CYP2D6*5 analyse. Eén controle die geen CYP2D6*5 allel heeft en één controle die naast een wildtype allel ook een CYP2D6*5 allel heeft. X is het verkregen resultaat van de hierboven beschreven Patiënt X.

wildtype allel werden niet gevonden. De positieve en negatieve controles waren goed.

Bij de LightCycler analyse, om aan te tonen of het CYP2D6*4 allel aanwezig is, werden geen smeltpieken gevonden. Omdat de LightCycler een techniek is die gebaseerd is op real time PCR was in het gedeelte van de amplificatie zichtbaar dat er geen productvorming had plaatsgevonden. Bij de controle samples was wel duidelijk productvorming zichtbaar en de smeltcurves waren bij de controle samples ook zoals verwacht (figuur 1).

Bij de multiplex long PCR voor CYP2D6*5 werd alleen een product van 3,2kb gevonden. Dit houdt in dat bij deze patiënt beide CYP2D6 genen gedeleteerd zijn.

Bij de tetra-primer PCR voor CYP2D6*6 werden geen specifieke producten gevonden. Zowel het 750bp controle product als het 421bp product, wat specifiek is voor het wildtype allel, als het 356bp product wat specifiek is voor het CYP2D6*6 allel, werden niet gevonden. De positieve en negatieve controles waren goed.

Bij de multiplex long PCR voor de duplicatie werd geen specifiek product gevonden. Zowel de positieve als negatieve controle waren goed.

Bij de analyse voor CYP2C19*2, een PCR gevolgd door een digestie met *Sma*I, werden twee fragmenten gevonden met de lengten 212bp en 109bp. Dit houdt in dat de patiënt geen CYP2C19*2 allelen heeft.

Bij deze patiënt verklaren de resultaten afkomstig van de analyse voor CYP2D6*5 het niet verkrijgen van goede resultaten bij de andere CYP2D6 analyses. Doordat beide CYP2D6 genen gedeleteerd zijn, kunnen de primers gebruikt bij de analyses CYP2D6*3, CYP2D6*4, CYP2D6*6 en CYP2D6*1/2/4x2 niet meer binden op de voor de afzonderlijke primers specifieke stukjes complementaire DNA. Dit verklaart waarom er bij deze analyses geen specifieke productvorming plaatsvond. Deze patiënt heeft een verlaagde activiteit van het CYP2D6 iso-enzym, terwijl de activiteit van het CYP2C19 iso-enzym normaal zal zijn.

Conclusie

Beide voorbeelden laten zien hoe belangrijk genotyperingresultaten kunnen zijn voor de individuele patiënt. Na het genereren van deze data worden de resultaten altijd teruggekoppeld aan een apotheker, die de resultaten weer koppelt aan de bloedspiegeluitslagen van de voorgeschreven medicatie. De apotheker neemt vervolgens contact op met de behandelend arts van de patiënt om het behandelprogramma van de patiënt indien nodig te veranderen of bij te stellen. Op dit moment zijn aanvragen voor een genotypering afkomstig van een behandelend arts uit de kliniek of wordt een arts benaderd door een apotheker om een genotyperingaanvraag te doen bij een patiënt vanwege vraagtekens bij serumspiegels en/of effectiviteit van een therapie. Het kost enige tijd en inspanning om aan het genotyperen bekendheid te geven richting kliniek en artsen als mogelijke diagnostiek in de behandeling van psychiatrische patiënten.

[1] Sachse C, Brockmoller J, Bauer S et al. Cytochrome p450 2D6 variants in a caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *Am.J.*

*Hum. Genet.*60:284-295,1997.

- [2] Steijns L.S.W., van der Weide J. Ultrarapid drug metabolism: PCR-based detection of CYP2D6 geneduplication. *Clin Chem* 1998; 44:914-917.
- [3] Weide van der J., Steijns L.S.W. Cytochrome P450 enzyme system: genetic polymorphisms and impact on clinical pharmacology. *Ann Clin Biochem* 1999;36:722-729.
- [4] Bergh van den F.A.J.T.M., Bon M.A.M., Kraan H et al. De rol van het Cytochrom P450-systeem op de kinetiek van geneesmiddelen, in het bijzonder van psychofarmaca. *Ned Tijdschr Klin Chem* 1999;24:220-223.
- [5] Hersberger M, Marti-Juan J, Rentsch K, Hänseler E. Rapid detection of the CYP2D6*3, CYP2D6*4, and CYP2D6*6 alleles by tetra-primer PCR and of the CYP2D6*5 allele by multiplex long PCR. *Clin Chem* 2000;46: 1072-1077.
- [6] Bjerke J, Chang C-C, Schur C, Wong S, Nuwayhid. Genotyping of Cytochrome P450 2D6*4 mutation with fluorescent hybridization probes using lightcycler. *Rapid Cycle Real-Time PCR: Methods and Applications.* Springer-Verslag Berlin Heidelberg 2001:105-110.